

Università degli Studi di Napoli “Federico II”

Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in Scienze Biologiche

*Ruolo delle miosine non muscolari di classe II*

*nella patologia umana*

Docente-guida:

prof. A. Savoia

Controrelatore:

prof. V. Calabrò

Candidato:

Mariateresa Di Stazio

## **Indice**

### **Introduzione..... 5**

1. Struttura e funzione delle miosine non muscolari di classe II (NMMHC-II)6
2. Funzione delle miosine di classe II.....7
3. NMMHCII-Myh9 and “Myosin related disease”.....8
  - 3.1 Le mutazioni del gene Myh9: ipotesi di patogenesi molecolare .....9
4. NMMHCII-Myh10 .....11

### **Obiettivo della tesi ..... 14**

### **Risultati e discussione..... 17**

1. Studio di espressione della myh9, myh10 e myh14 nei tessuti di topo. ....18
2. Sviluppo del palato nell’uomo e nel topo .....24
- 3.NMMHC-Myh9 è fortemente espressa durante lo sviluppo del palato .....26
4. Ruolo del gene Myh9 nella palatoschisi.....31
- 5.NMMHC-Myh14 e sordità .....35

### **Materiale e metodi..... 43**

- 1.Ottenimento embrioni e sezioni .....44
- 2.Ibridazione in situ .....44
3. Immunoistochimica Myh9 in palato e Myh14 in coclea .....47
4. RT-PCR .....48
5. Immunofluorescenza su sezioni di palato.....48

## **Bibliografia**

## Sommario

Le miosine non muscolari di classe II sono proteine motore che interagiscono con l'actina. Nei vertebrati sono presenti tre isoforme delle miosine non-muscolari di classe II: la Myh9, Myh10 e Myh14 codificate da tre differenti geni. Le tre miosine non muscolari presentano un'elevata omologia nella struttura primaria, che varia tra il 64 e l'80%. Molto alta è anche l'omologia tra le isoforme umane con i rispettivi ortologhi murini. La Myh9 è responsabile di una rara patologia umana nota come "*myosin related disease*"(MYH9RD). I pazienti MYH9RD, nascono con piastrinopenia, inclusioni citoplasmatiche e sviluppano nel corso della loro vita insufficienza renale, cataratta e sordità. Questa tesi di dottorato nasce dall'esigenza di capire la patogenesi nella MYH9RD. Abbiamo così iniziato una serie di studi di espressione effettuati su cellule e su tessuti di topo prelevati da topi a diverso stadio embrionale e su tessuti adulti. Da questi dati di espressione abbiamo ricavato nuove informazioni sulla funzione delle miosine non-muscolari. Riteniamo infatti, che la funzione delle tre isoforme possa essere ridondante e che ciò contribuisca al caratteristico fenotipo dei pazienti.

Inoltre abbiamo trovato un'inattesa espressione della myh9 nel palato murino che abbiamo indagato in modo più approfondito; oggi proponiamo la myh9 come nuovo gene candidato per la palatoschisi.

Un chiaro e forte segnale della miosina myh14 osservato in alcuni distretti cellulari della coclea ci ha indotto ad approfondire lo studio della myh14 nella sordità non sindromica. Confermati i dati di espressione è stato condotto uno screening di mutazioni del gene myh14 in un campione di 300 pazienti con

sordità non sindromica. I risultati ci hanno permesso di identificare una mutazione nonsense e tre mutazioni di missenso.

## **Abstract**

Class II non muscle myosins are proteins who interact with actin to produce movement. Three non-muscle myosin heavy chains (NMMHC) of class II, Myh9, Myh10, and Myh14, have been reported in vertebrates. In humans, they are encoded by three different genes. The three isoforms are well conserved through the entire molecule mainly in the motor and tail domains of the heavy chain. The Myh9 is responsible for a human disease, called “*MYH9-related disease*” (MYH9RD). All patients manifest a congenital form of thrombocytopenia with giant platelets and leukocyte inclusions and they may develop hearing impairment, cataract and/or renal lesions. The pathogenesis of MYH9RD is still unclear due to the lack of knowledge. To better understand at which developmental stages and in which tissues the gene is active, we studied its expression in mouse at several embryonic stages, as well as in neonatal and adult tissue. Moreover, we compared the expression of myh9 to that of myh10 and myh14. Our starting hypothesis was that myh9, myh10 and myh14 can compensate for each other when they are coexpressed in the same tissues. Thanks this expression studies we found abundant and specific expression of the myh9 gene in mouse palate. We considered myh9 as a potential candidate for non-syndromic cleft lips with or without cleft palate. After demonstrating that myh14 is highly expressed in mouse cochlea, we performed a mutational screening in 300 hearing-impaired patients, and we found two missense mutations and one non-sense mutation.

## **Introduzione**

## **1. Struttura e funzione delle miosine non muscolari di classe II (NMMHC-II)**

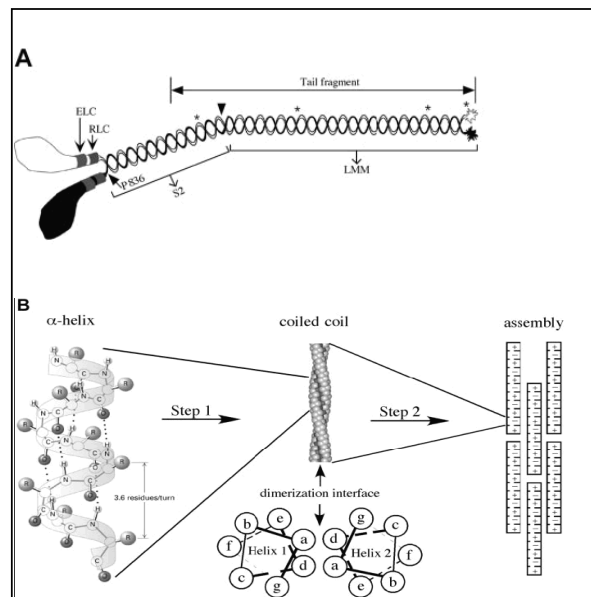
Le miosine costituiscono una vasta famiglia di proteine motore che interagiscono con l'actina per produrre movimento e vengono raggruppate in 18 differenti classi<sup>1</sup>. La classe II comprende le miosine muscolari (muscolatura striata, cardiaca e liscia) e non muscolari<sup>2</sup>.

Le miosine non muscolari di classe II, sono enzimi esamerici composti da 2 catene pesanti (NMMHC-II, non muscle myosin heavy chain II) (220 kDa) e due paia di catene leggere (17 e 15 kDa). La dimerizzazione delle catene pesanti NMMHC-II, determina la formazione di una struttura in cui si distinguono due porzioni N-terminali che formano le due teste globulari responsabili dell'attività ATPasica e del legame all'actina (dominio motore); un collo, che partecipa, al legame e all'amplificazione della forza meccanica; la porzione C-terminale, avvolta in una struttura "coiled-coil", che permette alla miosina II di polimerizzare nel filamento bipolare. L'assemblaggio delle NMMHC-II, avviene pertanto in due fasi: (1) la dimerizzazione di due  $\alpha$ -eliche e (2) l'associazione laterale, nel corretto registro, del dominio coiled-coil per formare il filamento bipolare funzionale<sup>2,3</sup> (Fig.1).

Nei vertebrati sono presenti tre isoforme delle miosine non-muscolari di classe II; sono la NMMHC **IIA**, NMMHC **IIB** e NMMHC **IIC** codificate da tre differenti geni umani, rispettivamente Myh9, Myh10 e Myh14, e localizzati, in uomo, rispettivamente sul cromosoma 22q12.3, 17p13.1, 19q13.3 e in topo sul cromosoma 15, 11, 7. Le tre miosine non muscolari presentano un'elevata omologia nella struttura primaria, che varia tra il 64 e l'80%. Molto alta è anche

l'omologia tra le isoforme umane con i rispettivi ortologhi murini che in alcune regioni supera il 96% di omologia<sup>4,5</sup>.

(Per semplificare la nomenclatura e la lettura di questa tesi di dottorato, sia i geni che le proteine saranno indicati come Myh9, Myh10, Myh14 e nel topo myh9, myh10, myh14)<sup>6</sup>.



**Fig.1 Schema della NMMHC-Myh9**

A) Mostra le 2 catene pesanti e le catene leggere;  
B) fasi dell'assemblaggio.

## 2. Funzione delle miosine di classe II

Sebbene sia ben documentato il ruolo delle miosine muscolari nella produzione di forza contrattile, poco si conosce circa il ruolo funzionale delle miosine non-muscolari<sup>2</sup>. Studi *in vitro* hanno evidenziato un loro coinvolgimento in diversi processi cellulari, come nella citochinesi, nella fagocitosi; partecipano inoltre alla mobilità cellulare e al mantenimento della forma cellulare, ma la loro specifica funzione nelle diverse cellule non è ancora nota<sup>7</sup>.

### 3. NMMHCII-Myh9 and “Myosin related disease”

Tra queste miosine non-muscolari di classe II, la miosina Myh9 è responsabile di una rara malattia genetica umana nota come “*myosin related disease*” (MYH9RD) e per questo motivo è l’isoforma più studiata sia *in vitro* che *in vivo* e su cui il laboratorio in cui lavoro, da diversi anni, sta focalizzando la propria attenzione<sup>8</sup>.

Tutti i pazienti affetti da questa patologia presentano alla nascita piastrinopenia con livelli di piastrine che variano da  $18 \times 10^9/L$  a  $129 \times 10^9/L$  e caratteristiche inclusioni leucocitarie simili ai corpi di Döhle, note inclusioni citoplasmatiche fortemente basofile<sup>9,10</sup>. Alcuni pazienti sono destinati a sviluppare negli anni successivi glomerulonefrite cronica e/o deficit uditivo neurosensoriale e/o cataratta presenile. Prima dell’identificazione del gene causativo, i pazienti erano diagnosticati come affetti da Sindrome di Fechtner, Sindrome di Epstein, Anomalia di May-Hegglin o Sindrome di Sebastian (FTNS, EPTS, MHA e SBA) in funzione del quadro clinico di presentazione<sup>11</sup>. Tale classificazione è da ritenersi tuttavia superata perché non in grado di descrivere la complessità dei quadri fenotipici conseguenti alle mutazioni nel gene Myh9<sup>11</sup>.m

L’identificazione di Myh9 come unico gene malattia per la MYH9RD, ha favorito lo sviluppo di un test laboratoristico per la diagnosi di MYH9RD e l’identificazione dei pazienti da sottoporre all’analisi molecolare. Infatti, gli aggregati leucocitari contengono la proteina Myh9 che consente di evidenziarli mediante tecniche di immunoistochimica<sup>10</sup>. Il test laboratoristico quindi consiste nell’analisi della distribuzione della proteina Myh9 nei granulociti su striscio di sangue.



### 3.1 Le mutazioni del gene Myh9: ipotesi di patogenesi molecolare

La patogenesi di questa malattia (MYH9RD), non è ancora ben chiara a causa delle limitate conoscenze sulla funzione della miosina Myh9 e della difficoltà di ottenere biopsie di pazienti e di cellule in coltura.

La maggior parte delle mutazioni nel gene Myh9 sono sostituzioni di aminoacidi localizzate in pochi codoni, ben conservati nell'evoluzione, con funzione non ancora definita. Tra le altre alterazioni due sono piccole delezioni in-frame, mentre alcune sono mutazioni stop-codon e frame-shift che cadono nell'ultimo esone codificante (fig.2).

Per comprendere la funzione della Myh9 e i meccanismi patogenetici responsabili della “*myosin related disease*” è importante capire gli effetti delle mutazioni sulla funzionalità proteica. E' presumibile che le mutazioni nella testa globulare possono alterare il legame con l'actina e con l'ATP, mentre le mutazioni nel dominio coiled-coil possono interferire con l'associazione delle catene pesanti e l'assemblaggio delle molecole di miosina Myh9 nei filamenti bipolari. Infatti, studi *in vitro* rivelano che le mutazioni N93K e R702C localizzate nel dominio motore della proteina riducono l'attività ATPasica della miosina e la sua capacità a legare l'actina<sup>12</sup>.

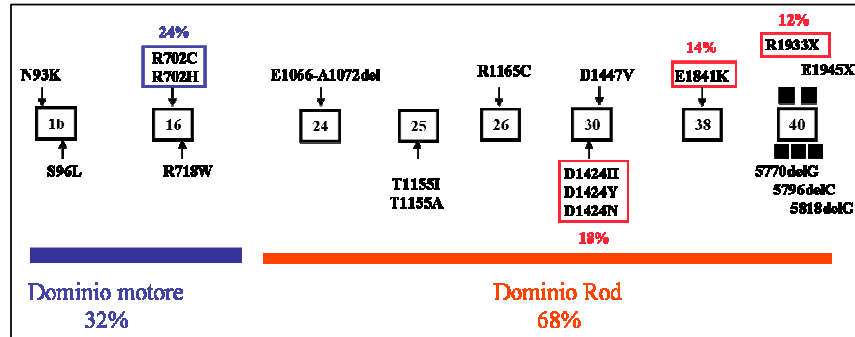
Tuttavia, non è ancora chiaro se le mutazioni nel gene Myh9 interferiscono con la stabilità della proteina e conseguente aploinsufficienza, oppure se esercitano un effetto dominante negativo impedendo la corretta dimerizzazione di Myh9 o il corretto assemblaggio dei filamenti bipolari. Nelle cellule normali la miosina Myh9 ha una distribuzione diffusa ed omogenea nel citoplasma; nei neutrofili la proteina si aggrega in inclusioni che si presentano con numero e forma differenti: da uno o due grandi complessi a piccoli aggregati sparsi in tutto il

citoplasma, lasciando presupporre un effetto dominante negativo delle mutazioni.

Un recente studio ha indagato la distribuzione della Myh9 nelle piastrine, nei megacariociti e nei granulociti neutrofili, in pazienti MYH9RD con diverse mutazioni: 4 mutazioni missense (N93K, R1165C, D1424N E E1841K) e due stop codon (R1933X e E1945X). Hanno rilevato una riduzione della proteina Myh9 nelle piastrine di circa il 50% rispetto i soggetti sani. In particolare nei pazienti con la mutazione R1933 o con E1945X, utilizzando due anticorpi, uno che riconosce la testa della proteina (presente sia nella proteina wild type , che nella mutante) e uno che riconosce la regione C-terminale della proteina (presente solo nella proteina wild type) hanno potuto indagare la natura della proteina presente nelle piastrine e nei megacariociti. Hanno costatato una riduzione del 50% della proteina wild type e l'assenza della forma mutata sia nelle piastrine che nei megacariociti, chiara evidenza di un meccanismo di *aploinsufficienza*. Dato che, negli aggregati dei granulociti dei pazienti con la mutazione R1933 e E1945X hanno invece, trovato sia la proteina wild type, sia la proteina mutata, è stato ipotizzato un meccanismo di *dominanza negativa*. Quindi nei granulociti dei pazienti MYH9RD la proteina mutata si aggrega alla proteina wild type formando i caratteristici aggregati evidenti nei granulociti dei pazienti MYH9RD<sup>13</sup>.

Quindi dai suddetti dati, risulta che le diverse proteine mutanti possano manifestare proprietà ed effetti differenti nelle varie cellule, ossia un effetto dominante negativo nei granulociti neutrofili e un effetto di aploinsufficienza nei megacariociti e nelle piastrine. La ragione per cui la miosina si comporta in

modo diverso nei due tipi cellulari non è ancora chiara, saranno necessarie ulteriori ricerche per meglio comprendere questo particolare aspetto.



**Fig.2** Rappresentazione delle 20 diverse mutazioni identificate in 50 famiglie italiane affette da MYH9RD. La maggior parte delle alterazioni sono mutazioni missense. Le uniche mutazioni di stop o frameshift sono localizzate nell'ultimo esone (esone 40). Il 68% delle mutazioni si distribuiscono nel dominio rod mentre il 32% in quello motore. Si può inoltre notare che 4 mutazioni, quelle che colpiscono i residui 702, 1424, 1841 e 1933 sono quelle che insieme costituiscono il 68% di tutte le mutazioni..

Studi *in vivo* su topi knock-out, non hanno permesso di migliorare le nostre conoscenze sulla funzione molecolare di Myh9, in quanto la distruzione in omozigosi di questo gene è incompatibile con la vita e il topo muore allo stadio embrionale E.6,5. A questo stadio nessun organo è ancora ben sviluppato e quindi non è stato possibile eseguire studi utili per comprendere i meccanismi molecolari di questo gene. Sono stati condotti studi solo sulle cellule dei sui corpi embrioidi myh9<sup>-/-</sup>, che rispetto a quelle wild-type, presentano un difetto nell'adesione cellulare, causato da un'alterazione della localizzazione di alcune proteine coinvolte nel sistema di adesione tra le cellule, come le E-caderine e  $\beta$ -caderine<sup>14</sup>.

#### 4. NMMHC-Myh10

La miosina myh10 è stata studiata *in vivo* utilizzando un modello animale knock-out (KO), ossia un topo geneticamente modificato in cui è stato distrutto

il gene che codifica l'isoforma myh10<sup>15</sup>.

Il topo KO myh10, muore subito dopo la nascita a causa di numerose e gravi malformazioni cardiache e cerebrali, che lasciano ipotizzare un suo importante ruolo nello sviluppo del cervello e del sistema cardiaco. In particolare il topo KO myh10 sviluppa idrocefalite durante lo sviluppo embrionale tra lo stadio E.14 e P0, e presenta anche evidenti difetti nella migrazione delle cellule neuronali all'altezza del quarto ventricolo. Le malformazioni a livello cardiaco riscontrate comprendono: miociti cardiaci ipertrofici e anomalie dell'aorta<sup>16</sup>.

La patogenesi di queste malformazioni cardiache e cerebrali non è ancora nota; anche se questi studi hanno condotto alla formulazione di una serie di ipotesi sul suo coinvolgimento nello sviluppo del sistema cardiaco e cerebrale<sup>17</sup>.

Recenti studi hanno dimostrato, attraverso immunofluorescenza e microscopia confocale, l'espressione della myh10 nelle linee Z e nei dischi intercalari<sup>18</sup>.

Eliminato: Z-line

Questa localizzazione lascia ipotizzare un suo ruolo su elementi che sono coinvolti nella trasmissione di forze e nel mantenere l'integrità dei miociti durante la contrazione. L'assenza della myh10, potrebbe quindi distruggere la normale struttura miofibrillare e condurre a una ipertrofia cardiaca. Inoltre i miociti del topo myh10<sup>-/-</sup> si presentano ridotti in numero e di dimensioni maggiori rispetto ad un controllo wild-type; si ipotizza in questo caso ad un difetto della citochinesi in cui la myh10 svolge un noto e documentato ruolo.

È stato creato anche un topo con una mutazione nel gene myh10, per ricombinazione omologa, la mutazione inserita è la R709C<sup>19</sup>. È stata scelta questa mutazione in quanto presente in una regione molto conservata nelle tre miosine e anche perché una mutazione simile nell'isoforma Myh9 (R702C) causa la nota malattia genetica, "*myosin related disease*". Il fenotipo

dell'omozigote è risultato molto simile al KO myh10, con alterazioni cardiache e cerebrali. Attualmente non è nota nessuna patologia umana causata da mutazioni nel gene Myh10.

Ancora meno si conosce sulla funzione dell'isoforma Myh14, solo recentemente caratterizzata e studiata<sup>20,4</sup>.

## **Obiettivo della tesi**

Questa tesi di dottorato nasce dall'esigenza di capire la patogenesi nella MYH9RD e di spiegare perchè mutazioni della miosina Myh9, anche se espressa in tutti i tessuti, determinano un fenotipo patologico solo in alcuni organi. I pazienti MYH9RD, nascono con piastrinopenia e inclusioni citoplasmatiche e sviluppano nel corso della loro vita anche insufficienza renale, cataratta e sordità.

Come atteso, il gene presenta un'espressione ubiquitaria, ed abbiamo osservato una presenza maggiore di trascritto nei tessuti e organi che sono affetti nei pazienti: coclea, epitelio cristallino nelle sezioni sia embrionali che adulte e nel rene adulto. Un segnale specifico di myh9 è presente anche nel fegato embrionale sede nei vertebrati dell'ematopoiesi, nei megacariociti e nei granulociti neutrofili. L'espressione di myh9 è stata, tuttavia, ritrovata anche in tessuti apparentemente non implicati nella clinica dei pazienti. Allo stadio embrionale E.14.5 abbiamo osservato, infatti, una specifica ed elevata espressione nell'epitelio del palato, nei follicoli piliferi, nelle ghiandole lacrimali e nell'epitelio che ingloba i denti. Ci siamo quindi posti l'interrogativo del perché nei pazienti con mutazioni nel gene Myh9, oltre al fenotipo descritto, non si osservano anche difetti del palato o delle altre strutture in cui è stato evidenziato un forte segnale di espressione di myh9.

Come è noto dalla letteratura, nei vertebrati esiste un'altra miosina non muscolare, Myh10, fortemente omologa alla Myh9, localizzata sul cromosoma 17. Grazie al progetto genoma umano è stato inoltre possibile determinare che esiste un'ulteriore isoforma, Myh14 localizzato sul cromosoma 19, recentemente caratterizzata.

Abbiamo, quindi, ritenuto opportuno indagare anche sul pattern di espressione di myh10 e myh14 nell'ipotesi che un meccanismo di compensazione da parte di queste isoforme potesse spiegare il fenotipo osservato nei pazienti.

Per questo motivo, nonostante i numerosi lavori che descrivono l'espressione delle miosine-II, era necessario condurre uno studio sistematico sulle miosine non-muscolari di classe II (NMMHCII) in modo tale da definire in modo più dettagliato il pattern di espressione.

Lo studio è così iniziato con la caratterizzazione del pattern di espressione delle tre isoforme (myh9, myh10, myh14) partendo dal presupposto che una conoscenza approfondita dell'espressione, di uno di questi geni, in una determinata cellula o tessuto può indirizzare verso uno studio dettagliato e soprattutto mirato di questi geni. Da questi studi sono infatti emersi risultati inaspettati sulle isoforme myh9 e myh14 che ci hanno portato ad indagare nuove importanti implicazioni e nuove funzioni che questi geni hanno in due distinte e frequenti patologie genetiche, rispettivamente palatoschisi e sordità.



## **Risultati e discussione**

## **1. Studio di espressione della myh9, myh10 e myh14 nei tessuti murini**

Per comprendere i meccanismi molecolari della Myh9 e in particolare la patogenesi delle MYH9RD, abbiamo eseguito studi di espressione su tessuti a diversi stadi embrionali e su tessuti adulti di topo. Frequentemente, infatti, una chiara e forte espressione di un trascritto in un particolare tessuto è correlata ad una specifica funzione del gene in quel tessuto.

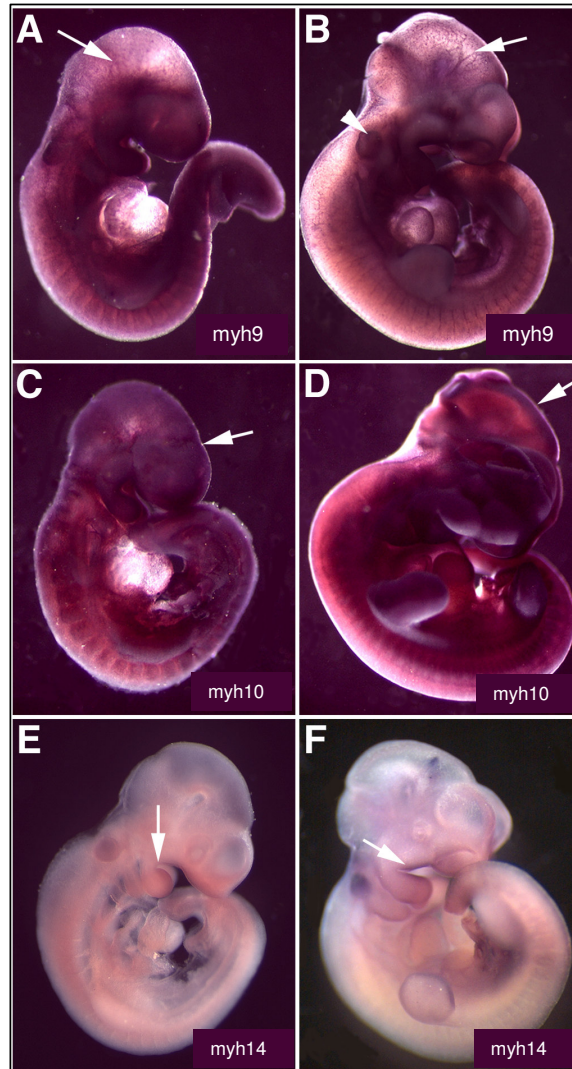
La patogenesi della MYH9RD non è ancora chiara a causa delle limitate conoscenze sulla funzione della Myh9 e delle limitate conoscenze sulla sua distribuzione e espressione nei tessuti murini. Per capire a che stadio e in che tessuti la myh9 è espressa abbiamo iniziato i nostri studi di espressione su sezioni di topo a diverso stadio embrionale e su tessuti adulti.

Come è noto dalla letteratura, nei vertebrati esiste un'altra miosina non muscolare, Myh10, fortemente omologa alla Myh9, localizzata sul cromosoma 17. Grazie al progetto genoma umano è stato inoltre possibile determinare che esiste un'ulteriore isoforma, Myh14 localizzato sul cromosoma 19, recentemente caratterizzata.

Abbiamo, quindi, ritenuto opportuno indagare anche il pattern di espressione di myh10 e myh14 per spiegare il fenotipo osservato nei pazienti.

In una prima fase abbiamo analizzato i pattern di espressione delle tre miosine non-muscolari attraverso esperimenti di ibridazione *in situ* su embrioni interi di topo (whole mount) allo stadio embrionale E9.5 e E10.5 (embryonic day 9.5 e 10.5). Sono state generate sonde specifiche utilizzando porzioni della 3'UTR di myh9, myh10 e myh14 dove minore è l'omologia tra le diverse isoforme per evitare possibili cross-ibridazioni. Come si vede dall'immagine myh9 e myh10

presentano una forte e ubiquitaria espressione; meno intenso ma comunque omogeneo è il segnale della myh14 (fig3).



**Fig3. ibridazione *in situ*** su embrioni di topo della myh9, myh10 e myh14, a diverso stadio di sviluppo embrionale. (A, C, E) E.9.5; (B, D ,F) 10.5. Le frecce in \_A e B indicano l'espressione nei vasi sanguigni della myh9. In C e D è indicata l'espressione della myh10 nel cervello. L'espressione della myh14 negli archetti branchiali e nella faringe è indicata dalla freccia nella figura E e F.

Anche se l'espressione delle tre isoforme sembra essere molto simile, già in questo primo esperimento abbiamo potuto notare delle differenze tra le tre

miosine. Allo stadio E9.5 e E10.5 il trascritto myh9 non presenta espressione nel sistema nervoso dove invece l'isoforma myh10 è fortemente espressa, come noto dai dati di letteratura. La myh9 è invece, visibile nell'endotelio dei vasi della testa e allo stadio E10.5 si nota un segnale specifico nell'otocisti, anche questa descritta in letteratura.

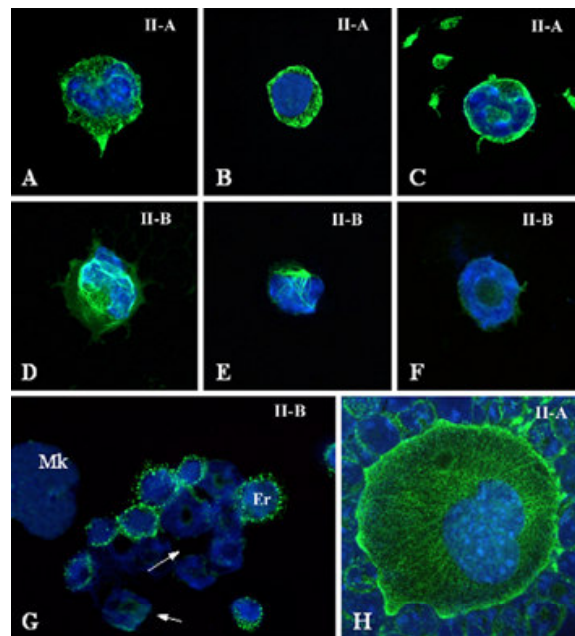
L'isoforma myh14, in entrambi gli stadi embrionali, è invece visibile negli archetti branchiali e nella faringe. L'espressione dei trascritti è stata, in seguito, analizzata in modo più approfondito e dettagliato su striscio di sangue, e su sezioni di topo allo stadio E14, P0 e su sezioni di tessuto adulto, mostrando specifiche e distinte espressioni dei tre geni.

Sappiamo che la Myh9 è l'isoforma responsabile della “*myosin related disease*”, caratterizzata da alterazioni congenite delle piastrine, inclusioni nei granulociti, sordità, cataratta e insufficienza renale. Come atteso abbiamo evidenziato un segnale specifico della myh9 nei megacariociti e nei granulociti neutrofili (fig.4), nella coclea, nell'epitelio del cristallino sia nelle sezioni embrionali che dell'adulto e nel rene adulto (fig.5). Abbiamo trovato un segnale di espressione anche nel fegato embrionale, sede nei vertebrati dell'emopoiesi (fig.6).

Utilizzando sonde specifiche per la myh10 e myh14, abbiamo indagato il segnale anche di queste due isoforme. La myh10 e myh14 non sono espresse nei megacariociti e nei granulociti, che sono alterati nei pazienti.

Siamo rimasti colpiti da alcune espressioni che la myh9 ha presentato in tessuti non anomali nei pazienti MYH9RD (fig.7). Allo stadio embrionale E14.5, la myh9 presenta un debole segnale nei follicoli piliferi, nell'abbozzo del dente e una forte e interessante espressione nell'epitelio dei foglietti palatini. I trascritti myh10 e myh14, così come myh9, presentano una forte espressione nella coclea,

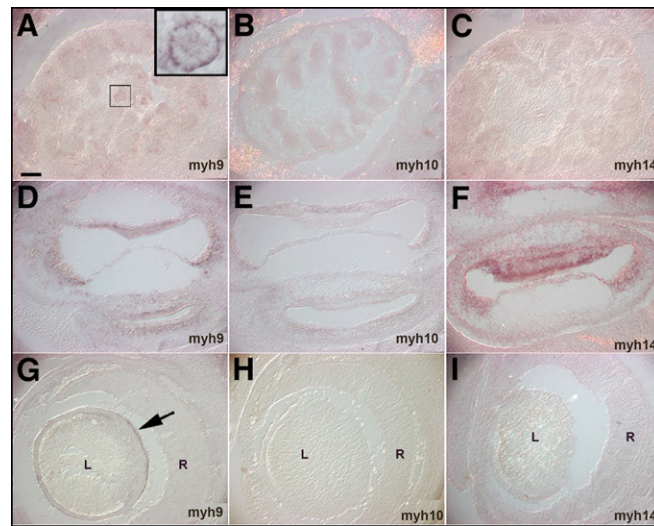
nel rene e nell'occhio, organi in cui gli effetti patologici insorgono in età adulta. Questo dato potrebbe indicare che myh10 e myh14 possono solo parzialmente compensare il difetto della miosina myh9<sup>21</sup>. Inoltre la miosina myh14 presenta un pattern di espressione sovrapponibile a quello della myh9 nell'epitelio del palato, negli endoteli dei vasi sanguigni, nei follicoli piliferi, nei denti e nelle ghiandole lacrimali. Sono quei tessuti e organi che pur esprimendo elevati livelli di myh9 non presentano anomalie nei pazienti.



**Fig4.** distribuzione della proteina myh9, myh10, in cellule del sangue murino. (A,D) monociti; (B, E) linfociti; (C,F) granulociti neutrofili. La miosina myh10 non è espressa nei granulociti neutrofili anomali nei pazienti MYH9RD. (G) immunofluorescenza su cellule del midollo osseo. La myh10 è espressa negli eritroblasti, la myh9 è l'unica isoforma espressa nei megacariociti (H).

Abbiamo così formulato un'ipotesi secondo la quale le isoforme myh10 e myh14 possono compensare il difetto di myh9 solo se espresse nelle stesse cellule. In accordo con questa ipotesi, il primo effetto delle mutazioni si osserva nelle piastrine e nei granulociti neutrofili dove è presente solo myh9 e myh10 e/o myh14 non possono esercitare un ruolo compensativo. Tutti i pazienti

presentano, infatti, macropiastrinopenia e inclusioni leucocitarie sin dalla nascita. Le altre manifestazioni patologiche come nefrite, cataratta e sordità, invece si manifestano durante la vita. In questi organi abbiamo evidenziato una coespressione delle tre isoforme. Siamo andati ad indagare in modo più approfondito l'espressione proteica delle tre isoforme nella coclea, nel rene e nell'occhio attraverso immunoistochimica su un embrione P0.

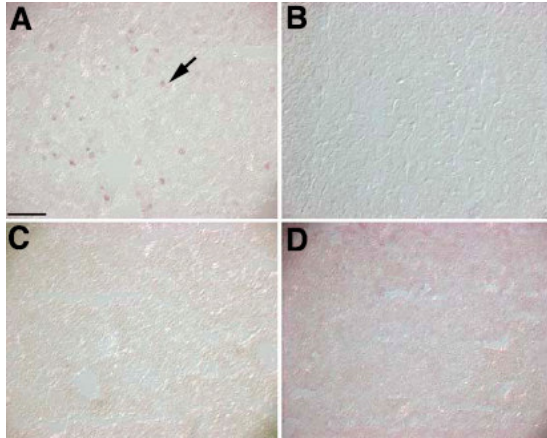


**Fig5.** espressione delle isoforme delle miosine di classe II nei tessuti affetti da nella myosin related disease attraverso ibridazione in situ. (A, B e C)rene embrionale allo stadio E.14.5; (D, E, e F) coclea neonatale allo stadio P0. (G, H e I) occhio embrionale allo stadio E14.5. L, (lens) cristallino e R retina. Barra di scala 100un.

Nella coclea, in particolare abbiamo evidenziato una diversa localizzazione proteica delle tre isoforme: la myh14 è espressa nell'organo del Corti, e nella stria vascularis; la myh9 è invece chiaramente espressa perifericamente all'organo del Corti e dato che è nota in letteratura la presenza di miosine a livello delle stereociglia, stiamo procedendo con una microscopia elettronica per verificare se anche myh9 presenta la medesima localizzazione.

La myh10 ha un'espressione diversa ma meno chiara delle altre isoforme.

Nell'occhio myh9 è espressa nella retina, myh14 nel cristallino e myh10 non sembra avere espressione. Per quanto riguarda il rene non è ancora chiara l'espressione delle tre miosine, che stiamo indagando.



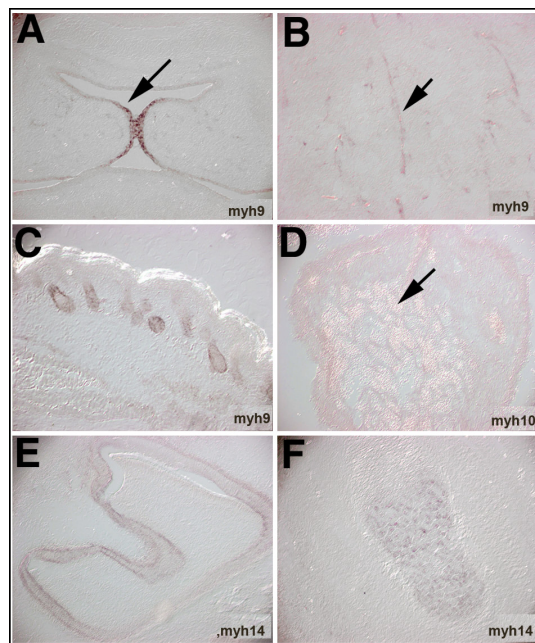
**Fig6.** ibridazione in situ nel fegato fetale (A, C, D) e adulto (B), con probe antisense myh9 (A, B), myh10 (C) e myh14 (D). la freccia indica i foci ematopoietici nel fegato embrionale (E14.5). L'espressione scompare nel fegato adulto.

Secondo la nostra ipotesi è possibile che in questi organi, coclea, occhio, rene le isoforme essendo espresse in diversi tipi cellulari, anche se presenti nello stesso organo non riescono a compensare totalmente il difetto della myh9.

La myh10, come noto dai dati

di letteratura, è espressa nel cuore e la myh14 nella cartilagine e nell'epitelio dell'abbozzo del dente E14.5, compensando il difetto della myh9 in questi organi e tessuti<sup>16</sup>.

Da questi studi di espressione, siamo rimasti colpiti da alcune inaspettate espressioni: elevati livelli di espressione della myh14 nella coclea e della myh9 nel palato. Partendo da questa prima analisi di espressione abbiamo approfondito i nostri studi e cercato di determinare un possibile ruolo della myh9 nella palatoschisi e di myh14 nella sordità.



**Fig7.** distribuzione dell'mRNA della myh9, myh10 e myh14 nei tessuti di topo. (A) palato allo stadio E14.5 la freccia indica l'espressione della myh9. (B) segnale della myh9 nei vasi sanguigni di una testa allo stadio embrionale E14.5; (C) i follicoli piliferi allo stadio P0 esprimono la myh9 e la myh14 (data not show). (D) myh10 è trascritta nel cuore E14.5; l'epitelio dell'abbozzo del dente allo stadio P0 esprime la myh14, come nella myh9(data not show); (F) espressione della myh14 nella cartilagine.

**Tabella 1**

Summary of myh9, myh10, myh14 expression in mouse tissues			
Mouse tissue <sup>a</sup>	myh9	myh10	myh14
Embryonic liver foci	++		
Embryonic kidney	++	+	+
Embryonic eye	++ (lens epithelium)	+ (retina)	+ (lens and retina)
Embryonic palate	++		+
Embryonic vessel endothelium	++		
Hair follicles	++		+
Cochlea	++	+	+++
Developing teeth	++		+
Lachrymal gland	++		+
Embryonic and neonatal central nervous system		++	+
Heart		+	+/-
Embryonic cartilage			+
Embryonic gut	+	+	+

<sup>a</sup> Tissue indicated as embryonic are at stage E14.5, whereas the others are neonatal (P0).

<sup>b</sup> Relative levels of expression of each probe in different tissues: +/-, very low; +, low; ++, medium; +++, high.



## **2. Sviluppo del palato nell'uomo e nel topo**

Malformazioni durante lo sviluppo del palato e al labbro sono patologie molto comuni causate da complesse e ancora non ben conosciuti meccanismi patogenetici dovuti all'interazione tra fattori genetici e ambientali<sup>22</sup>.

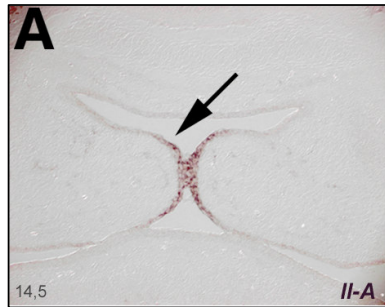
La palatoschisi è una malformazione congenita e consiste in una fessura del palato che mette in comunicazione la cavità nasale con quella boccale. Si accompagna in genere alla fessura dell'osso mascellare e del labbro superiore. Nell'uomo, a partire dalla IV-VI settimana di vita embrionale, attorno allo stomodeo, che è la primitiva cavità buccale, si formano delle formazioni chiamati processi. Questi processi tendono a fondersi gli uni con gli altri per dare origine alle diverse strutture della faccia.

Il palato da un punto di vista embriologico viene suddiviso in palato primario e palato secondario. Il palato primario, deriva dal processo nasale: il setto nasale, formatosi dal processo frontale medio, si accresce verso il basso fondendosi con i processi palatini. L'unione fra palato primario e palato secondario forma il palato duro.

Nonostante lo sviluppo del palato nel topo manifesti alcune differenze con quello nell'uomo, il modello murino è ampiamente utilizzato per studiarne i meccanismi implicati.

### 3. NMMHC-myh9 è fortemente espressa durante lo sviluppo del palato

Il primo segnale del gene myh9 nel palato lo abbiamo rilevato, mediante ibridazione *in situ* su mRNA, su una sezione coronale di testa di topo allo stadio



**Fig8.** ibridazione *in situ* della myh9 nel palato embrionale di topo allo stadio E14.5.

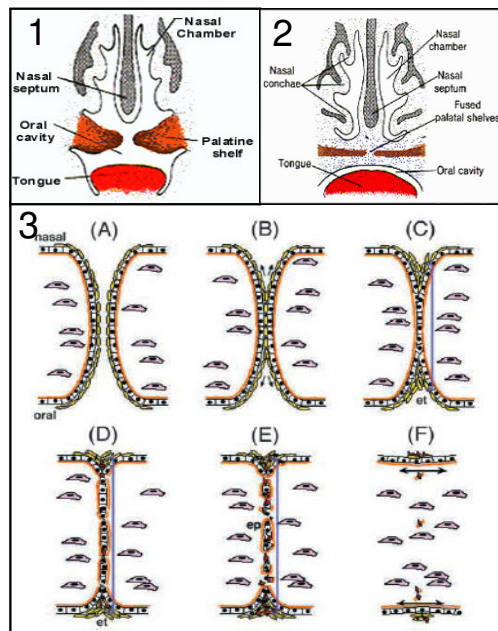
embrionale E14.5, stadio in cui i foglietti palatini, già disposti orizzontalmente alla lingua, sono molto vicini (fig.8).

Nel topo, infatti, il palato si sviluppa a partire dallo stadio embrionale E11.5, in cui i foglietti palatini iniziano a crescere nella cavità orofarigea, prima

verticalmente al lato della lingua, e in seguito si alzano sopra la lingua nella cavità orale (Fig9-1,2)<sup>23</sup>. Allo stadio E14.5 i due foglietti palatini si avvicinano allungandosi orizzontalmente fino ad avvicinare il tessuto epiteliale di ogni foglietto palatino (MEE, medial edge epithelial tissue). Allo stadio E15.5 le MEE, grazie all'emissione di filopodi e lamellipodi delle cellule epiteliali che li rivestono, si uniscono per formare una giuntura mediana epiteliale (MES, medial epithelial seam). In seguito attraverso meccanismi non ben definiti, tra cui una trasformazione epitelio-mesenchimale, migrazione e apoptosi, le cellule epiteliali della regione MES scompaiono del tutto per lasciare il palato completamente fuso allo stadio E15.5<sup>24</sup> (fig.9-3).

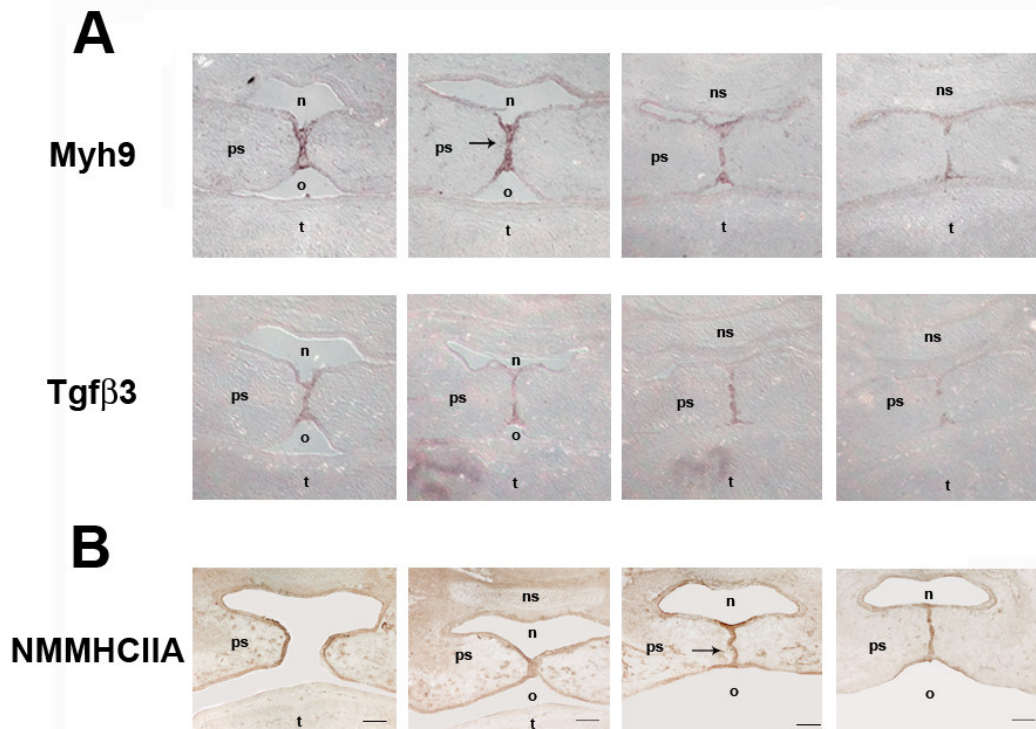
Nella fig.8, l'espressione del gene myh9 è ben visibile nella MES, nella regione di contatto dei foglietti palatini, mentre nessun segnale è presente nella cavità boccale e nasale.

In seguito, l'analisi è stata condotta su sezioni coronali in diversi momenti dello sviluppo del palato (fig. 10A). Prima del contatto dei foglietti palatini, non è presente il segnale, al momento del contatto delle cellule epiteliali con la formazione della MES si ha la massima espressione della *myh9*. Con il procedere della fusione, il segnale si circoscrive alle due regioni epiteliali triangolari che si vengono a formare nella cavità nasale e nella cavità boccale, e si evidenzia in aree note come *epithelial pearl*, cellule epiteliali ancora presenti nella MES. Infine, il segnale scompare dalla MES e si restringe esclusivamente alle regioni epiteliali triangolari verso la cavità nasale e boccale, per poi sparire del tutto a fusione terminata.



**Fig9. Rappresentazione schematica della fusione del palato**

Nella figura sono rappresentati i diversi momenti di questo complesso meccanismo. 1) si notano in arancione i foglietti palatini disposti orizzontalmente sopra la lingua; 2) i foglietti palatini si avvicinano per fondersi nella cavità orale; 3)(A) i foglietti si avvicinano accostando le cellule peridermali (in giallo), che si trovano sopra le cellule MEE (in bianco) che emettono filopodi e proteoglicani che permettono l'adesione delle cellule peridermali. (B) primo contatto e adesione tra le cellule peridermali formando la MES. L'adesione diventa più forte e le cellule si spostano sopra e sotto la MES formando dei caratteristici triangoli peridermali. (C) la MES si trasforma in un singolo strato di cellule epiteliali; (D) la MES inizia a regredire e si formano le *epithelial pearls* (ep). Le cellule epiteliali e le cellule nei triangoli epiteliali e nelle *epithelial pearls*, (in rosso) iniziano andare in apoptosi. (E) la MES degenera a causa della morte cellulare e le cellule in apoptosi attivano la degradazione della lamina basale (in arancione). (F) Infine la fusione risulta completa con una trasformazione in cellule mesenchimali (EMT). La linea arancione rappresenta la lamina basale. In rosa sono rappresentate le cellule mesenchimali.



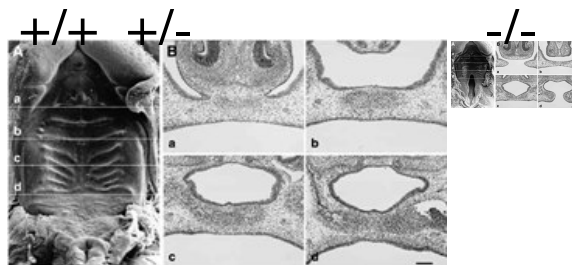
**Fig.10** A) ibridazione in situ su sezioni coronali di palato allo stadio embrionale E14.5. confronto tra l'espressione della myh9 e del TGFβ3. B) immunohistochimica

Numerosi sono i fattori e i meccanismi molecolari implicati nella formazione del palato. Alcuni geni, tra cui MSX1, IRF6 e TGFβ3, svolgono un ruolo diretto in questo processo come dimostrato dal fatto che mutazioni in questi geni sono responsabili di sindrome con difetti del palato<sup>25</sup>. In particolare il fattore di crescita TGFβ3 è considerato il “*master-gene*” per la palatoschisi, dato che mutazioni in questo gene creano schisi del palato senza altre malformazioni cranio-facciali<sup>26</sup>.

In particolare l'espressione temporale e spaziale dei fattori di crescita TGFβ1, TGFβ2e TGFβ3 è stata studiata in modo approfondito durante lo sviluppo del palato. Questi studi sperimentali hanno evidenziato un loro importante ruolo durante l'allungamento dei foglietti palatini e la loro fusione. La costruzione del

topo knock-out ha dimostrato che  $TGF\beta 3^{-/-}$  sviluppa schisi parziale del palato che porta alla morte 24 ore dopo la nascita<sup>27</sup>. Il knock-out di  $TGF\beta 1$  non sviluppa schisi del palato e solo il 23% dei topi knock-out di  $TGF\beta 2$  sviluppano schisi del palato con numerose malformazioni cranio-facciali..

Nell'embrione del topo  $TGF\beta 3^{+/+}$  e  $+/ -$  allo stadio E15.5 la fusione del palato è totale e non è più visibile la MEE, mentre tutti gli embrioni del topo  $TGF\beta 3^{-/-}$  presentano schisi del palato. La schisi può essere di due tipi: parziale (più frequente), o totale (più rara). Nella schisi parziale si forma una grossa fessura del palato posteriormente e una fessura più piccola anteriormente visibile ancora allo stadio embrionale E16.5<sup>28</sup> (fig.11).



**Fig11. immagine di microscopia elettronica a scansione del palato di topo.**

Allo stadio embrionale del topo  $+/+$  e  $+/ -$  E16.5. (B a-d) si nota la fusione totale del palato anteriormente, al centro e posteriormente. Nel topo omozigote  $TGF\beta 3^{-/-}$  allo stadio E16.5 si nota una piccola schisi anteriore nel palato, e una schisi molto più grande nella parte posteriore.. Barra di scala 100un

Coerentemente con il suo ruolo nel processo di formazione del palato,  $TGF\beta 3$  risulta abbondantemente e specificamente espresso nel palato.

Per questo motivo abbiamo generato una sonda per analizzare l'espressione di  $TGF\beta 3$ , e metterla in relazione con quella di *myh9*.

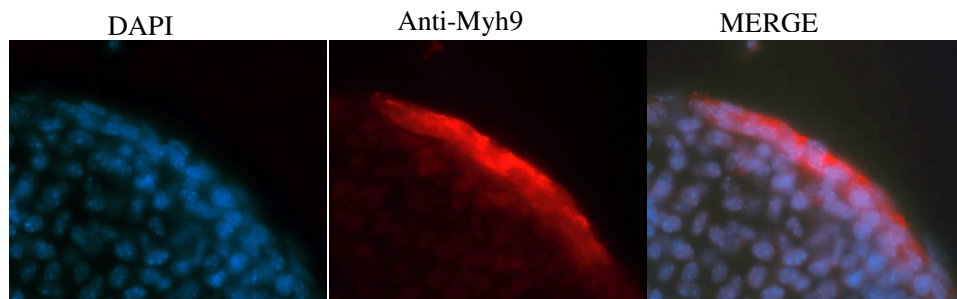
Come evidenziato nella figura 10, il pattern di espressione della *myh9* è risultata molto simile a quella di  $TGF\beta 3$  sia da un punto di vista temporale che spaziale rafforzando la nostra ipotesi secondo la quale la *myh9* può svolgere un

importante ruolo nello sviluppo del palato, così come il fattore di crescita TGF $\beta$ 3 (fig10A).

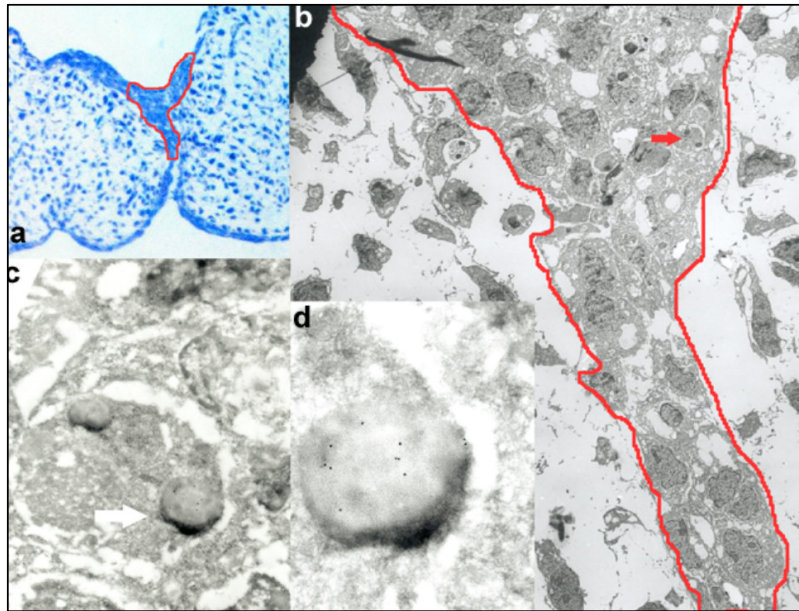
Per valutare se ad elevati livelli di espressione dell'mRNA corrispondesse anche un'elevata espressione della proteina, sono stati condotti studi di immunoistochimica e immunofluorescenza, utilizzando un anticorpo che riconosce specificamente la miosina myh9. Come l'mRNA, anche la proteina myh9 è molto espressa nei foglietti palatini, in particolare nella MES, durante la fusione del palato primario (fig.10 B) (fig.12).

Abbiamo analizzato l'espressione della miosina myh9 in modo più dettagliato grazie alla microscopia elettronica. Come indicato nella fig.13, la proteina si concentra in particolari corpuscoli citoplasmatici presenti nelle cellule dei foglietti palatini al momento della fusione, che tendono a scomparire a fusione avvenuta. Ancora non conosciamo la natura di queste strutture, anche se strutture molto simili sono state descritte in letteratura<sup>29</sup>.

Ulteriori indagini utilizzando appropriati marcatori ci permetteranno di comprendere la natura di questi organelli ricchi di miosina.



**Fig 12 immunofluorescenza** su sezione di palato allo stadio embrionale 14.5 della myh9. Evidente l'espressione della proteina nella regione epiteliale dei foglietti palatini.



**Fig13. immunogold SEM della myh9 nel palato embrionale di topo allo stadio E14.5.**(a) sezione del palato E14.5 in esame, in rosso è evidenziata la regione analizzata e ingrandita in (b); (c) ingrandimento della cellula indicata con una freccia in b che presenta il segnale. (d) maggiore ingrandimento dei corpuscoli citoplasmatici che contengono la myh9.

#### 4. Ruolo del gene Myh9 nella palatoschisi

Sulla base degli studi di espressione abbiamo ipotizzato un ruolo del gene myh9 nello sviluppo del palato. Per questo motivo è stata attivata una collaborazione con il gruppo del prof. Paolo Carinci (Università di Bologna) che ha raccolto la più grossa casistica di labio-palato-schisi, sono stati condotti studi di associazione tra il gene myh9 e i pazienti con alterazioni nel palato. Per eseguire questo studio di associazione, sono stati studiati otto SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) intragenici al locus Myh9, presenti in una regione regolativa, in 218 pazienti affetti da labio-palatoschisi non sindromica (CL/P). Lo SNP

rs3752462 ha rivelato una significativa distorsione della trasmissione allelica ( $p=0.02$ ) che aumenta se analizzato con rs2009930 ( $p<0.001$ ). Sono stati inoltre definiti gli aplotipi significativamente più trasmessi da pazienti con CL/P da genitori eterozigoti. Questi aplotipi sono caratterizzati o dall'allele A o dall'allele C rispettivamente dei marcatori rs3752462 e rs2009930, o da entrambi gli alleli.

Nonostante sulla base degli studi di espressione e analisi genetica ci siano forti evidenze del ruolo di Myh9 nel sviluppo del palato, è importante ricordare che mutazioni nel gene Myh9 causano la MYH9RD e che nei pazienti con questa malattia non è mai stata riscontrata una malformazione nel palato.

E' importante inoltre ricordare, come indicato nell'introduzione, la peculiarità delle mutazioni, per lo più mutazioni missense che colpiscono solo una ventina dei 1960 amminoacidi di cui è costituita la proteina identificate nei pazienti MYH9RD. In particolare quattro residui aminoacidici: 702, 1424, 1881 e 1933 sono mutati nel 50% dei pazienti. Non possiamo escludere quindi, la possibilità che varianti da quelle che causano la MYH9RD possano rappresentare fattori di suscettibilità alla palatoschisi. Infatti la palatoschisi essendo una complessa malattia multifattoriale, è probabile che sia il risultato dell'azione congiunta di più fattori genetici e ambientali; è quindi probabile che una variante polimorfica del gene della Myh9, il cui effetto patogenetico è difficile da dimostrare, in associazione con altre varianti presenti in geni diversi, possa alterare il meccanismo di formazione del palato.

Anche se molto poco si conosce sulla funzione delle miosine di classe II, è noto e ben documentato il loro ruolo nella citochinesi, nella contrazione, nel movimento degli organelli citoplasmatici, e nella riorganizzazione del



citoscheletro della cellula. È quindi probabile che la miosina Myh9 possa svolgere una funzione durante le diverse fasi della fusione del palato, incluso la trasformazione epitelio-mesenchima, la migrazione delle cellule epiteliali o anche nella morte cellulare. Infatti, la trasformazione delle cellule epiteliali in mesenchimali richiede alterazioni nella morfologia della cellula, nell'adesione tra le cellule e nella loro capacità di spostarsi, tutti meccanismi in cui la Myh9 sicuramente ha un ruolo importante. Anche l'apoptosi è un momento che richiede cambiamenti nella morfologia della cellula e nella disintegrazione nucleare, ma il legame tra la Myh9 e l'apoptosi non è ancora mai stato indagato.

Nel topo TGFβ3  $+/+$  e  $+/-$  sulla superficie della MEE, prima del contatto tra i foglietti, compaiono numerosi filopodi e lamellipodi visibili con microscopia elettronica, che presumibilmente facilitano l'avvicinamento dei foglietti, la successiva fusione, la trasformazione epitelio-mesenchimale e la migrazione delle cellule epiteliali. Questi filopodi sono completamente assenti nel topo TGFβ3  $-/-$  (fig14.)<sup>28</sup>. Anche studi *in vitro* di *inteferece* del gene TGFβ3 su palati in coltura, hanno evidenziato gli stessi risultati, schisi del palato e assenza di filopodi. L'aggiunta nel mezzo di TGFβ3 nei palati in coltura, induce e la ricomparsa dei filopodi e la fusione del palato, confermando il ruolo di TGFβ3 nella formazione di queste propaggini e quindi nella fusione del palato<sup>28</sup>.

Considerato che la myh9 presenta un pattern di espressione sovrapponibile al TGFβ3, non possiamo escludere che la miosina myh9 sia implicata nella formazioni di queste propaggini, nella formazione delle quali possiamo ipotizzare l'intervento del sistema actina-miosina.

Altri gruppi, hanno studiato nel topo TGFβ3 $-/-$  la distribuzione delle cellule del sistema di adesione E-caderina, che sono coinvolte nel sistema di adesione

epiteliale durante lo sviluppo. Nel topo  $TGF\beta 3^{-/-}$  la distribuzione delle proteine di adesione, quali E caderina,  $\alpha$ -catenina,  $\beta$ -catenina,  $\beta$ -actina, è risultata alterata rispetto il topo wild-type<sup>36</sup>. È quindi probabile che un'alterazione di queste proteine di fusione, non permettendo una normale adesione tra le cellule epiteliali, conduca ad una non corretta fusione del palato.

Una localizzazione anomala delle proteine di adesione cellulare è stata osservata anche nei topi KO myh9 sia nei corpi embrioidi che nell'embrione allo stadio di sviluppo embrionale E.6.5<sup>14</sup>. È quindi probabile, che un'alterazione di queste proteine di fusione, non permettendo una normale adesione tra le cellule epiteliali, conduca ad una non corretta fusione del palato.

E' di fondamentale importanza stabilire la relazione tra miosina Myh9 e  $TGF\beta 3$  definendo, per esempio, se l'espressione di Myh9 sia controllata da  $TGF\beta 3$  o viceversa.

## 5. NMMHC-myh14 e sordità

Come precedentemente accennato, un chiaro e forte segnale della miosina myh14 osservato in alcuni distretti cellulari della coclea ci hanno indotto ad approfondire un potenziale ruolo della myh14 nella sordità di tipo ereditario.

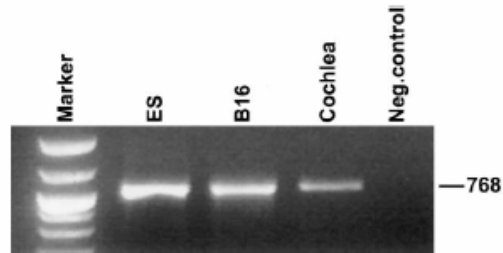
Numerosi geni svolgono un ruolo importante per la funzione dell'orecchio tra cui: connesine, fattori di trascrizione, geni del canale del potassio e altri componenti cellulari. Diversi membri della superfamiglia delle miosine sono coinvolti nella patologia dell'orecchio. Mutazioni nel gene MYO7A sono responsabile della sindrome di Usher 1B (MIM276903) e di due forme non sindromiche di sordità una dominante e una recessiva, rispettivamente DFNA11 e DFNB2. Il gene MYO6 è mutato nei pazienti affetti da DFNA22; MYO15A è responsabile della sordità DFNB3<sup>30</sup>. Recentemente è stata dimostrata l'importanza del gene IIIA (MYO3A) e IA (MYO1A) per un normale funzionamento della coclea, dato che sono coinvolti in due forme non sindromiche di sordità, rispettivamente DFNB30 e DFNA48<sup>31</sup>. Si ricorda che i pazienti MYH9RD sono affetti da una sordità neurosensoriale progressiva.

Prima di procedere ad un'ulteriore caratterizzazione, abbiamo constatato, utilizzando le banche dati, che il gene myh14 è localizzato sul cromosoma 19 nella regione critica del locus DFNA4, delimitata dai marcatori D19S412 e D19S246, mappato indipendentemente in due famiglie non imparentate<sup>32;33</sup>. Questo dato ulteriormente rafforzava l'ipotesi che il gene myh14 rappresentasse un forte candidato per la sordità.

Per confermare l'espressione del gene myh14 nella coclea, sono stati in seguito condotti studi di RT-PCR e immunohistochimica. L'RNA estratto da coclea di topo, cellule staminali embrionali di topo (TVB2), e da linea cellulare B16 di

melanoma di topo, è stato retro-trascritto per amplificare myh14. Come atteso, myh14 è espresso nella coclea (fig.14).

Per confermare l'espressione a livello proteico abbiamo eseguito una



**Fig.14** .RT-PCR della myh14, ES cells e B16 (melanoma) nel'RNA di coclea di topo l'RNA è stato estratto da coclea allo stadio embrionale E14, 15, 16, 18 e P0. Nel controllo negativo non è stato aliquotato il cDNA nella reazione. Marker: 1Kb DNA Ladder. (Biolabs)

immunoistochimica, su sezioni di

topo sagittali allo stadio P0

utilizzando un anticorpo

policlonale specifico per la

regione C-terminale della miosina

myh14<sup>20</sup>. Come si osserva nella

figure 15, la miosina myh14 è

espressa nell'organo del corti,

stria vascularis, così come nelle

cellule di Hensen e Claudius. La myh14 non è espressa nella membrana di

Reissner e non è visibile nessun segnale nell'epitelio vestibolare, diversamente

dall'espressione della Myh9 in coclea di ratto<sup>34</sup>. Confermati i dati di espressione,

in collaborazione con il gruppo di ricerca del prof. Paolo Gasparini è stato

condotto uno screening di mutazioni del gene myh14 in un campioni di 300

pazienti con sordità non sindromica. I pazienti sono stati selezionati sulla base

degli esami audiometrici e timpanometrici (presentavano un diverso grado di

sordità, in alcuni meno grave, molto seria in altri, con insorgenza variabile nei

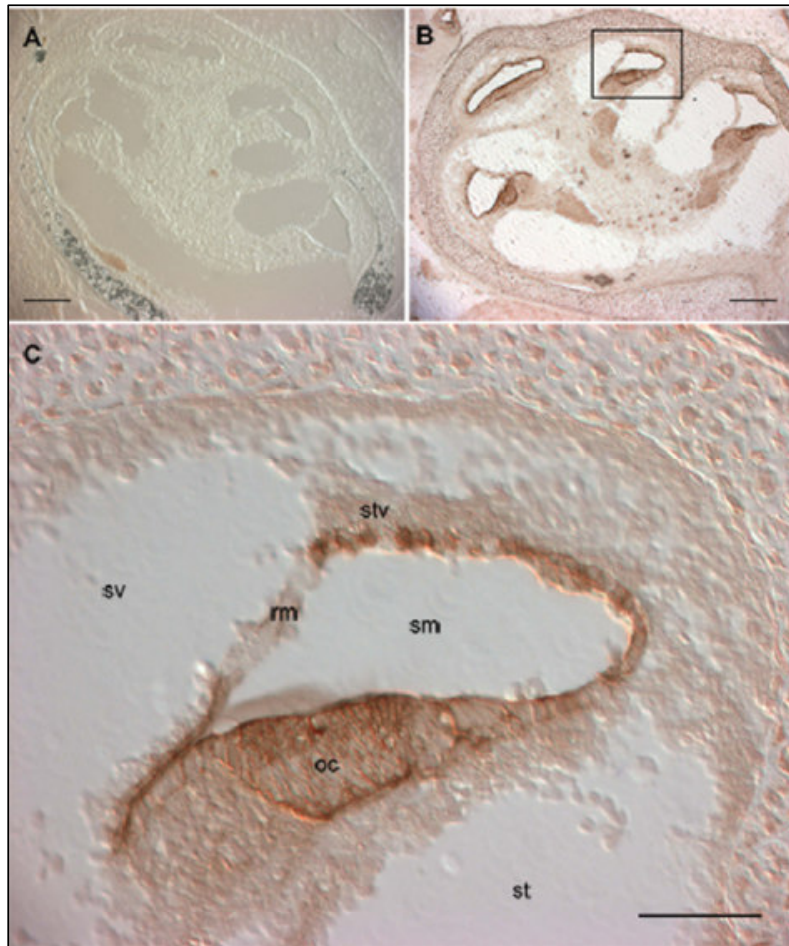
singoli soggetti) e dell'esclusione, mediante precedenti screening, di altri geni

come causa di malattia. La maggior parte degli individui analizzati provenivano

dal sud e dal centro Italia (200), 48 dalla Spagna, 52 dal Belgio. E' stata inclusa

nello studio anche una grande famiglia tedesca, che aveva in passato permesso di

mappare la regione candidata.



**Fig15. immunoistochimica della myh14** su sezioni di coclea di topo allo stadio embrionale E.14.5. A) controllo negativo in cui abbiamo utilizzato solo l'anticorpo secondario. B) localizzazione della myh14, ingrandimento in C) sv= scala vestibili, sm=scala media; st=scala tympany; rm=membrana di Reissner; oc=organo del corti; stv=stria vestibili;. Nessun segnale è presente nell'epitelio vestibolare. Barra di scala 20un.

Dallo screening di mutazioni abbiamo identificato una mutazione nonsense e tre mutazioni missenso (TAB.2)<sup>35</sup>. La prima mutazione identificata in tutti gli affetti

della famiglia tedesca è

Table 2			
Mutations Identified in the MYH14 Gene			
Mutation <sup>a</sup>	Exon	Effect	
		on Protein	Protein Domain
C20A	1	S7X	Motor domain
G1126T	9	G376C	Motor domain
C2176A	16	R726S	Tail
C2926T	22	L976F	Tail
<sup>a</sup> GenBank accession number NM_024729. (The A of the first methyonine is referred to as nucleotide +1.)			

una sostituzione

nucleotidica in eterozigosi

di una C con una A, nella

posizione 20, che porta a

una sostituzione

amminoacidica di una

serina in posizione 7, in

uno stop codon (S7X) (fig.16). In questo pedigree, gli individui affetti

presentano problemi di udito che compaiono durante la prima o seconda decade

di vita, che si sviluppa in una forma molto grave nella quarta decade della vita.

In un'altra famiglia è stata identificata una sostituzione nucleotidica G>T in

posizione 1126, che causa la sostituzione di una glicina con una cisteina nella

posizione 376 (G376C) nel dominio motore della proteina. Questa mutazione,

identificata in un bambino italiano di 9 anni, affetto da una forma moderata di

sordità, senza anomalie vestibolari, ma assente nei genitori è stata classificata

come mutazione *de novo* (fig.16).

Un'altra sostituzione C>A in posizione 2176 è stata identificata in una famiglia

belga. Questa sostituzione causa una sostituzione amminoacidica di un arginina

molto conservata, con una serina in posizione 726 (R726S) (fig.16). Siccome la

mutazione crea un sito di restrizione riconosciuto dall'enzima AlwNI, la

mutazione può essere facilmente identificata per PCR e digestione enzimatica.

Inoltre, siamo risaliti all'aplotipo della famiglia, una regione di 3-cM, che

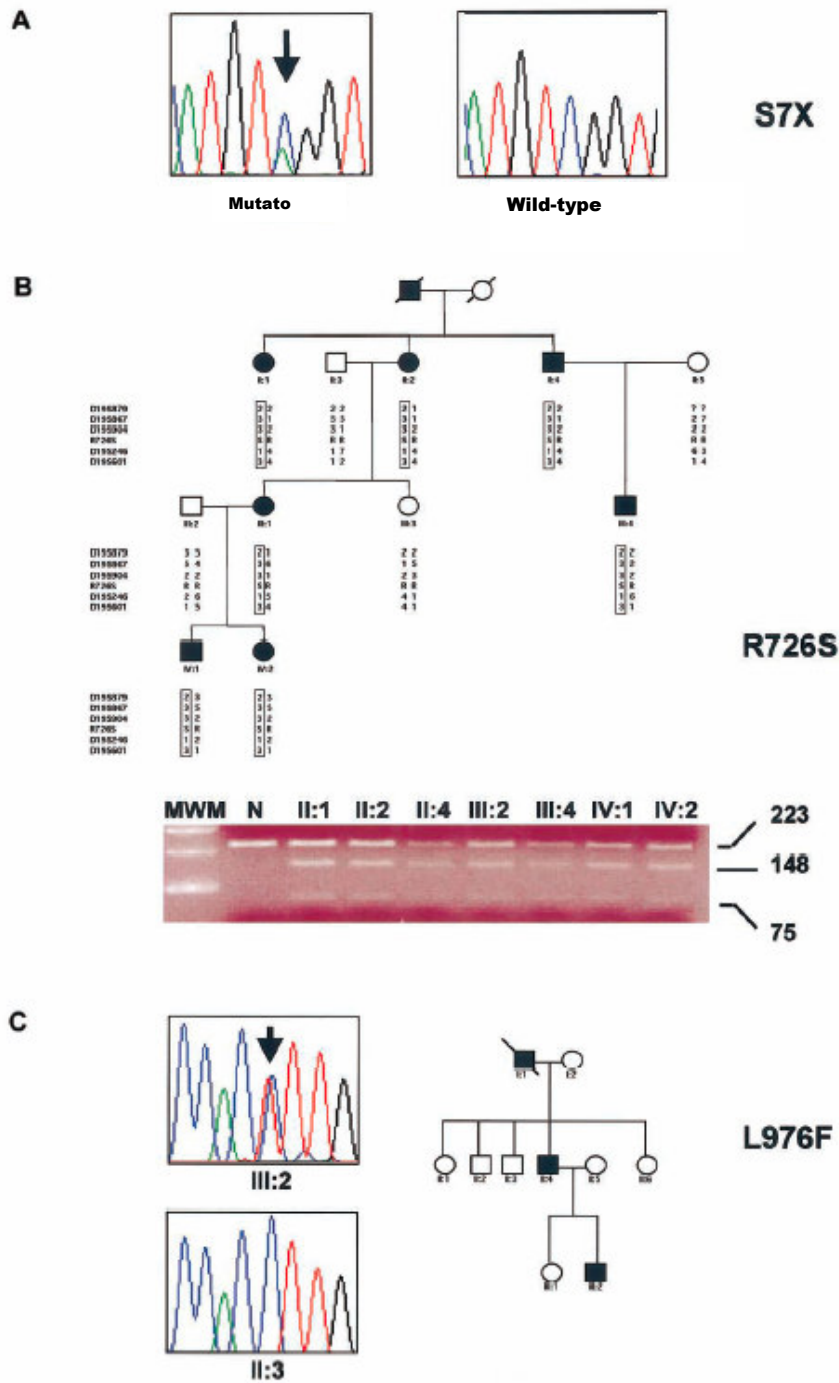
comprende il gene Myh14. Dato che tutti i membri affetti della famiglia, hanno lo stesso aplotipo, dal marcatore centromerico D19S879 al marcatore telomerico D19S601, possiamo concludere che in questa famiglia, la mutazione è in linkage con il locus DFNA4 e che la mutazione cosegrega con la malattia. Questi pazienti presentano una sordità progressiva senza anomalie vestibolari.

Infine, l'ultima mutazione, identificata nei membri affetti di una famiglia italiana (fig.16), è una sostituzione nucleotidica in eterozigosi di C>T in posizione 2926 nell'esone 22, che causa una sostituzione amminoacidica L976F nella regione C-terminale della proteina. Il probando ha ereditato la mutazione dal padre (II-4) e anche in questo caso la sordità si presenta lieve senza implicazioni vestibolari.

Le tre mutazioni missenso identificate, colpiscono residui conservati tra le specie (fig.17) e solo l'analisi funzionale permetterà di comprendere i meccanismi molecolari attraverso i quali queste mutazioni causano la sordità. Tutte le mutazioni sono state ricercate in 100 cromosomi di controllo provenienti da individui della stessa area geografica dei pazienti per escluderle come potenziali polimorfismi.

Sono state identificate anche 2 varianti proteiche polimorfiche I1266V e N1559S, 12 sostituzioni sinonime, e 7 sostituzioni nucleotidiche introniche (tabella 3). Dal momento che queste sostituzioni nucleotidiche non causano putativi siti criptici di splicing e non segregano con la malattia, sono state definite come varianti polimorfiche non causative.

|



**Fig.16** mutazioni non-senso e dissenso trovate nel gene *Myh14*. A) mutazione S7X. B) pedigree della famiglia belga con la mutazione R726S; pattern di digestione enzimatica con l'enzima AlwNI. L'aplotipo è stato costruito con marcatori attorno al gene *myh14*. C) pedigree di una famiglia italiana in cui è stata identificata la sostituzione amminoacidica L976F.



Il gene Myh14 è stato quindi, un ottimo candidato per la sordità, considerato che mappa in una regione critica per la sordità (DFNA4) ed è molto espresso nella coclea di topo. In seguito abbiamo identificato tre mutazioni missenso e una mutazione non-senso, in pazienti con difetti uditivi provenienti da diversi paesi. I pazienti con la mutazione di tipo missenso presentano un grado di sordità più lieve rispetto al paziente in cui è stata identificata la mutazione non-senso che presenta un grado di sordità molto grave.

Questo permette di individuare una correlazione genotipo-fenotipo, in cui la sordità peggiora con la riduzione della myh14.

Grazie a questo studio, abbiamo individuato la Myh14 come nuovo gene candidato per la sordità non-sindromica; studi futuri permetteranno di capire la sua funzione nella coclea e perché mutazioni in questo gene conducano al fenotipo osservato nei pazienti.

Table 3

Nucleotide Substitutions  
Identified in the Coding Region  
of the *MYH14* Gene

Nucleotide Variant	Exon	Effect on Protein
T474C	2	Silent
A796G	6	I266V
C1128T	9	Silent
C1731T	13	Silent
C1863T	14	Silent
C2082T	15	Silent
G1506A	21	Silent
A2895G	21	Silent
G4722A	32	Silent
A4676G	32	N1559S
A5307G	36	Silent
G5406T	37	Silent
T5745C	39	Silent
A5889T	40	Silent

NOTE.—The following intronic  
variants have also been detected:  
IVS2–44G→A, IVS5+19G→A,  
IVS7+8G→C, IVS8+13C→T,  
IVS12–7G→C, IVS21+11T→C,  
and IVS25+9C→T.

	G376	R726	L976
NMHC IIC Hs	SAVLQFGNIALKR 382	GVLEGIRICRQGF 732	QELAAHLEAEEGA 982
Mm	SAVLQFGNIVLKK 373	GVLEGIRICRQGF 723	QELAAHLEAEEGA 973
NMHC IIA Hs	SGVLQLGNIVPKK 356	GVLEGIRICRQGF 708	QLEEQLEEEESA 958
Rn	SGVLQLGNIVPKK 356	GVLEGIRICRQGF 708	QLEEQLEEEESA 958
NMHC IIB Hs	SSVLQFGNISFKK 363	GVLEGIRICRQGF 718	QDLEEQLEEEGA 968
Rn	SSVLQFGNISFKK 363	GVLEGIRICRQGF 715	QDLEEQLEEEGA 965
Mm	SSVLQFGNISFKK 363	GVLEGIRICRQGF 715	QDLEEQLEEEGA 965
SMMyBC Hs	SSVLQLGNIVPKK 363	GVLEGIRICRQGF 715	LDLEEQLEEEAA 965
Rn	SSVLQLGNIVPKK 358	GVLEGIRICRQGF 709	LDLEEQLEEEAA 965
Mm	SSVLQLGNIVPKK 363	GVLEGIRICRQGF 715	LDLEEQLEEEAA 965

Fig.17 allineamento della sequenza amminoacidica delle miosine non-muscolari e muscolari di classe II. Hs= Homo sapiens; Rn= Rattus norvegicus; Mm= Mus musculus.

## **Materiale e metodi**

## **1. Ottenimento embrioni e sezioni**

Gli embrioni di topo sono stati ottenuti da ceppo C57BL6J “Black Six” e CD1. Embrioni sono stati prelevati dalle madri, fissati in paraformaldeide al 4% in PBS 1X (Phosphate Buffer Saline) over night, ulteriormente fissati in saccarosio 30% fino alla loro totale immersione, e dopo un ulteriore passaggio in saccarosio 30% inclusi in matrice di inclusione O.C.T. (Kaltex) prima del congelamento con ghiaccio secco ed etanolo; gli embrioni così fissati sono stati conservati a – 80°C. Le sezioni di 20 µm di spessore sono state tagliate in un criostato a -20°C, collezionate e numerate.

## **2. Ibridazione *in situ***

Le sonde antisense di myh10 e myh14 sono stati ottenuti per amplificazione della 3'UTR del cDNA di cellule staminali murine. I prodotti di PCR sono stati successivamente clonati in pCRII TOPO (Invitrogen). La successiva digestione con l'enzima di restrizione BamHI e la trascrizione con il promotore T7 permette di ottenere la sonda antisense che abbiamo utilizzato in questo esperimento.

La sonda antisense myh9 di topo, è stato ottenuto tramite linearizzazione del clone AA575507 (IMAGE) con SalI e trascritto con RNA polimerasi SP6; mentre la digestione del plasmide con l'enzima di restrizione NotI e la successiva trascrizione con l'RNA polimerasi T7 ha prodotto la sonda *sense* che abbiamo utilizzato come controllo negativo dell'espressione.

Il probe TGFβ3 di topo è stato creato tramite l'amplificazione del cDNA ottenuto per retrotrascrizione dell'RNA di palato murino allo stadio embrionale E.14.5. Per l'amplificazione sono stati utilizzati i seguenti oligo:

TGFβ31F (5' GAGCCCCTGACCATCTTGTAC3') e

TGF $\beta$ 31R (5' CCTCTGCTTTTGAGTCCAGC3').

Il prodotto di PCR in seguito, è stato subclonato nel vettore PCRII-TOPO (TOPO TA Clonino, Invitrogen, Milan, Italy). Il plasmide è stato digerito con l'enzima BamHI (sonda antisenso) o con NotI (sonda senso) e trascritto rispettivamente con le RNA polimerasi T7 e SP6. Per l'esperimento di ibridazione in situ della myh9 e di TGF $\beta$ 3 in palato, sono state usate sezioni adiacenti.

Le sezioni sono state lavate in PBS1X e incubate con RIPA buffer per 10 min e in seguito 15 minuti in PFA4% in PBS. Sono state in seguito, trattate con trietanolamina buffer e acido acetico alla concentrazione finale 25 % per 15 minuti. Le sezioni sono state preibridate per 1 ora a temperatura ambiente con la soluzione di preibridazione precedentemente riscaldata a 70°C. Le sezioni sono state poi incubate con 300 ng di sonda, precedentemente denaturata a 60°C per 10 min, e lasciate in una cameretta umida per una notte a 70°C. Il giorno successivo, le sezioni vengono incubate con la soluzione di post-ibridazione per 1 ora. Seguono numerosi lavaggi per eliminare la sonda. Dopo aver effettuato due incubazioni di 1 ora ciascuna con soluzione di lavaggio a 70° C, le sezioni sono trattate con buffer B1 due volte per 5 minuti ciascuna e poi una volta per 20 minuti. A questo punto, la reazione è stata bloccata con buffer B2 per 1 ora a temperatura ambiente. In seguito si è proceduto con la reazione per rivelare la sonda ibridizzata con un'incubazione in presenza di anticorpi specifici per la digossigenina, con la quale sono marcati i nucleotidi usati nella trascrizione, coniugati con fosfatasi alcalina. L'incubazione è stata effettuata con gli anticorpi anti-dig diluiti 1:2000 over night a 4° C. Per eliminare l'eccesso di anticorpi i

vetrini sono lavati 2 volte per 5 minuti con buffer B1, e incubati per mezz'ora con buffer B3.

I vetrini sono così pronti per la reazione di sviluppo cromogeno con il reagente NBT/BCIP (nitro blu di tetrazolio/5-bromo-4-cloro-3-indolifosfato), substrato della fosfatasi alcalina, al quale è stato aggiunto Tween-20 0,1%. Il tempo di sviluppo variava, a seconda della sonda, da 2 ore a una giornata a temperatura ambiente, eventualmente over-night, a 4° C.

Nello sviluppo cromogeno la reazione avviene tra il BCIP e la fosfatasi alcalina che lo priva del gruppo fosfato e la concomitante riduzione del NBT che causa la tipica colorazione blu-violetta che riconosciamo come segnale. La reazione è stata in seguito bloccata lavando i vetrini 3-5 volte con PBS 1X + Tween-20 0,1%. Dopo un breve lavaggio con acqua DEPC i vetrini, fatti asciugare, sono stati montati con soluzione acquosa di montaggio AquaTex (Merck). Per acquisire le immagini sono stati usati microscopio e sistema fotografico AxioCam con relativo software di acquisizione (AxioVision), della Zeiss.

#### **Soluzioni utilizzate:**

RIPA buffer: NaCl con (150 mM), Igepal (1%) sodio deossicolato (0.5 %), SDS (0.1%), EDTA (1 mM;) e Tris pH 8.0 (50 mM).

Trietanolamina buffer: 985 ml di H<sub>2</sub>O e 12.3 ml di trietanolamina 100 %; portare a pH 8.0 con circa 2 ml di acido acetico 100 %; portare la soluzione a 1 litro con H<sub>2</sub>O.

Soluzione di preibridazione: formamide (50%), SSC (5X), Denhardts (5X) da una madre 20X, DNA di sperma di salmone (500 µg/ml) e RNA di lievito (250 µg/ml).

Camera umida costituita da: formamide (50%) e SSC (5X).

Soluzione di lavaggio: (50%), SSC (2X) e Tween-20 (0.1%).

Buffer B1: soluzione MAB pH 7.5(acido maleico 100 mM e NaCl 150 mM) e Tween-20 (0.1%).

Buffer B2: buffer B1 (90 %) e siero di pecora deplementato (10 %)

Soluzione con anticorpi anti-Dig: buffer B2 nel quale sono stati aggiunti anticorpi (Anti-Digoxigenin AP Fab fragments, Roche) diluiti 1 a 2000.

Buffer B3: Tris pH 9.5 (150 mM),  $MgCl_2$  (50 mM), NaCl (100 mM) e Tween-20 (0.1 %).

### **3. Immunoistochimica myh9 in palato e myh14 in coclea**

Per l'immunoistochimica, gli embrioni inclusi in OCT sono stati sezionati al criostato, sezioni di 20 $\mu$ m.

Le sezioni sono state fissate in PFA4% in PBS per 15min e in seguito, incubate in reagente di bloccaggio, 10% siero di capra in PBS, per 1 ora. Le sezioni così bloccate sono state incubate con l'anticorpo e senza l'anticorpo (controllo negativo per l'esperimento) contro la Myh9 (Covance, Princeton, New Jersey, USA) diluito 1: 200. Le sezioni sono state poi lavate per 5 volte con PBT per 30 minuti, successivamente incubate per trenta minuti con  $H_2O_2$  0.3% in PBT. Le sezioni sono state poi incubate con l'anticorpo secondario antirubbit coniugato con la biotina. Lavate con PBT per trenta minuti e incubate con la soluzione ABC (kit elite) per 30 minuti e infine sviluppate con DAB.

Per l'immunoistochimica sulla coclea l'anticorpo utilizzato è un anticorpo policlonale anti-NMMHC-Myh14 (buxton et al. 2003; Golomb et al. 2004).

#### **4. RT-PCR**

Gli oligo che abbiamo utilizzato per determinare la presenza della myh14 in RNA di coclea e in due linee cellulari, B16 (melanoma); e cellule staminali di topo (ES):

C1F: 5'AGCATTGGAAGAGGAGTCCC 3

C1R: 5'GCTCCAGTCGTTCTACAGC 3'

L' RNA di coclea ci è stato gentilmente donato da K.Avraham (Tel Aviv). È stato estratto da coclee di topo a diverso stadio di sviluppo embrionale, E14, E16, E18, e P0. Nel controllo negativo non è stato aliquotato il cDNA. Marker: 1-Kb Ladder (BioLabs).

#### **5. Immunofluorescenza su sezioni di palato**

Le sezioni di palato di topo allo stadio embrionale 14.5, sono state lavate in PBS1X, e successivamente fissate in PFA4% per 30 minuti. Per l'immunofluorescenza abbiamo utilizzato l'anticorpo primario policlonale contro la Myh9 (Covance, Princeton, New Jersey, USA) diluito 1: 70. Successivamente le sezioni sono state incubate con un'anticorpo secondario florescinato antirubbit (sigma), i vetrini sono stati montati con vectaschiel contenente DAPI e osservati al microscopio invertito ZEISS.



## **Bibliografia**

1. Berg, J.S., Powell, B.C. & Cheney, R.E. A millennial myosin census. *Mol Biol Cell* **12**, 780-94 (2001).
2. Sellers, J.R. Myosins: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta* **1496**, 3-22 (2000).
3. Franke, J.D., Dong, F., Rickoll, W.L., Kelley, M.J. & Kiehart, D.P. Rod mutations associated with MYH9-related disorders disrupt nonmuscle myosin-IIA assembly. *Blood* **105**, 161-9 (2005).
4. Buxton, D.B., Golomb, E. & Adelstein, R.S. Induction of nonmuscle myosin heavy chain II-C by butyrate in RAW 264.7 mouse macrophages. *J Biol Chem* **278**, 15449-55 (2003).
5. Simons, M. et al. Human nonmuscle myosin heavy chains are encoded by two genes located on different chromosomes. *Circ Res* **69**, 530-9 (1991).
6. Leal, A. et al. A novel myosin heavy chain gene in human chromosome 19q13.3. *Gene* **312**, 165-71 (2003).
7. Even-Ram, S. et al. Myosin IIA regulates cell motility and actomyosin-microtubule crosstalk. *Nat Cell Biol* **9**, 299-309 (2007).
8. Seri, M. et al. Mutations in MYH9 result in the May-Hegglin anomaly, and Fechtner and Sebastian syndromes. The May-Hegglin/Fechtner Syndrome Consortium. *Nat Genet* **26**, 103-5 (2000).
9. Kunishima, S. et al. Immunofluorescence analysis of neutrophil nonmuscle myosin heavy chain-A in MYH9 disorders: association of subcellular localization with MYH9 mutations. *Lab Invest* **83**, 115-22 (2003).
10. Pecci, A. et al. Immunocytochemistry for the heavy chain of the non-muscle myosin IIA as a diagnostic tool for MYH9-related disorders. *Br J Haematol* **117**, 164-7 (2002).
11. Seri, M. et al. MYH9-related disease: May-Hegglin anomaly, Sebastian syndrome, Fechtner syndrome, and Epstein syndrome are not distinct entities but represent a variable expression of a single illness. *Medicine (Baltimore)* **82**, 203-15 (2003).
12. D'Apollito, M., Guarnieri, V., Boncristiano, M., Zelante, L. & Savoia, A. Cloning of the murine non-muscle myosin heavy chain IIA gene ortholog of human MYH9 responsible for May-Hegglin, Sebastian, Fechtner, and Epstein syndromes. *Gene* **286**, 215-22 (2002).
13. Pecci, A. et al. Pathogenetic mechanisms of hematological abnormalities of patients with MYH9 mutations. *Hum Mol Genet* **14**, 3169-78 (2005).
14. Conti, M.A., Even-Ram, S., Liu, C., Yamada, K.M. & Adelstein, R.S. Defects in cell adhesion and the visceral endoderm following ablation of

- nonmuscle myosin heavy chain II-A in mice. *J Biol Chem* **279**, 41263-6 (2004).
15. Uren, D. et al. Gene dosage affects the cardiac and brain phenotype in nonmuscle myosin II-B-depleted mice. *J Clin Invest* **105**, 663-71 (2000).
  16. Tullio, A.N. et al. Nonmuscle myosin II-B is required for normal development of the mouse heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12407-12 (1997).
  17. Ma, X., Bao, J. & Adelstein, R.S. Loss of cell adhesion causes hydrocephalus in nonmuscle myosin II-B-ablated and mutated mice. *Mol Biol Cell* **18**, 2305-12 (2007).
  18. Takeda, K. et al. Nonmuscle myosin II localizes to the Z-lines and intercalated discs of cardiac muscle and to the Z-lines of skeletal muscle. *Cell Motil Cytoskeleton* **46**, 59-68 (2000).
  19. Ma, X., Kawamoto, S., Hara, Y. & Adelstein, R.S. A point mutation in the motor domain of nonmuscle myosin II-B impairs migration of distinct groups of neurons. *Mol Biol Cell* **15**, 2568-79 (2004).
  20. Golomb, E. et al. Identification and characterization of nonmuscle myosin II-C, a new member of the myosin II family. *J Biol Chem* **279**, 2800-8 (2004).
  21. Rochlin, M.W., Itoh, K., Adelstein, R.S. & Bridgman, P.C. Localization of myosin II A and B isoforms in cultured neurons. *J Cell Sci* **108**, 3661-70 (1995).
  22. Carinci, F. et al. Recent developments in orofacial cleft genetics. *J Craniofac Surg* **14**, 130-43 (2003).
  23. Cuervo, R. & Covarrubias, L. Death is the major fate of medial edge epithelial cells and the cause of basal lamina degradation during palatogenesis. *Development* **131**, 15-24 (2004).
  24. Cuervo, R., Valencia, C., Chandraratna, R.A. & Covarrubias, L. Programmed cell death is required for palate shelf fusion and is regulated by retinoic acid. *Dev Biol* **245**, 145-56 (2002).
  25. Kondo, S. et al. Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nat Genet* **32**, 285-9 (2002).
  26. Cui, X.M. & Shuler, C.F. The TGF-beta type III receptor is localized to the medial edge epithelium during palatal fusion. *Int J Dev Biol* **44**, 397-402 (2000).
  27. Proetzel, G. et al. Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion. *Nat Genet* **11**, 409-14 (1995).

28. Taya, Y., O'Kane, S. & Ferguson, M.W. Pathogenesis of cleft palate in TGF-beta3 knockout mice. *Development* **126**, 3869-79 (1999).
29. HAY, J.T.a.E.D. Analysis of the Role of Microfilaments and Microtubules in Acquisition of Bipolarity and Elongation of Fibroblasts in Hydrated Collagen Gels. *j,b,c*, (2004).
30. Wang, A. et al. Association of unconventional myosin MYO15 mutations with human nonsyndromic deafness DFNB3. *Science* **280**, 1447-51 (1998).
31. Walsh, T. et al. From flies' eyes to our ears: mutations in a human class III myosin cause progressive nonsyndromic hearing loss DFNB30. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7518-23 (2002).
32. Chen, A.H. et al. Linkage of a gene for dominant non-syndromic deafness to chromosome 19. *Hum Mol Genet* **4**, 1073-6 (1995).
33. Mirghomizadeh, F. et al. Second family with hearing impairment linked to 19q13 and refined DFNA4 localisation. *Eur J Hum Genet* **10**, 95-9 (2002).
34. Mhatre AN, L.Y., Atkin G, Maghnouj A, Lalwani AK. Expression of Myh9 in the mammalian cochlea: localization within the stereocilia.: *J Neurosci Res. Sep;84(4):809-18* (2006).
35. Donaudy, F. et al. Nonmuscle myosin heavy-chain gene MYH14 is expressed in cochlea and mutated in patients affected by autosomal dominant hearing impairment (DFNA4). *Am J Hum Genet* **74**, 770-6 (2004).
36. Consuelo tudela, et al. TGF- $\beta$ 3 is required for the adhesion and intercalation of medial edge epithelial cells during palate fusion. *Int. J. Dev. Biol.* **46**: 333-336 (2002).